

EUROPEAN PATENT OFFICE

D1

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 61152632
PUBLICATION DATE : 11-07-86

APPLICATION DATE : 26-12-84
APPLICATION NUMBER : 59278140

APPLICANT : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD;

INVENTOR : KIKUCHI HIROSHI;

INT.CL. : A61K 37/04

TITLE : ANTIARTERIOSCLEROTIC AGENT

ABSTRACT : PURPOSE: To provide a medicinal drug containing human apo-A-I phospholipid complex as an active component, having cholesterol-removing activity, etc., and useful as an antiarteriosclerotic agent.

CONSTITUTION: The objective agent contains human apo-A-I phospholipid complex. The phospholipid is preferably palmitoylphosphatidylcholine and/or sphingomyelin. the usefulness of the above complex as an antiarteriosclerotic agent has been ascertained from the activity to remove cholesterol from cultured smooth muscle cell of blood vessel, the quantitative and temporal distribution of the complex to the HDL fraction of serum after administration, and the effect to improve arteriosclerosis. The complex can be prepared from human apo-A-I and a phospholipid by conventional liposome-preparation process (e.g. cholic acid dialysis, ultrasonic process, ethanol injection process, Triton X-100 batch process, etc.). It is administered at a dose of 1.5~3.5g in terms of apo-A-I twice a week continuously for ≥ 1 month by intravenous injection.

COPYRIGHT: (C)1986,JPO&Japio

⑯ 日本国特許庁(JP)

⑰ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-152632

⑱ Int.Cl.⁴
A 61 K 37/04

識別記号
A B X

庁内整理番号
7138-4C

⑲ 公開 昭和61年(1986)7月11日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑳ 発明の名称 抗動脈硬化剤

㉑ 特 願 昭59-278140

㉒ 出 願 昭59(1984)12月26日

㉓ 発 明 者 富 川 宗 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
㉔ 発 明 者 若 杉 潤 一 郎 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
㉕ 発 明 者 石 原 正 直 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
㉖ 発 明 者 菊 池 寛 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
㉗ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

明 細 書

1. 発明の名称

抗動脈硬化剤

2. 特許請求の範囲

1) ヒトアポA-I・リン脂質複合体を含有する抗動脈硬化剤。

2) リン脂質がジベルミトイルホスファチジルコリンおよび／またはスフィンゴミエリンである特許請求の範囲第1項記載の抗動脈硬化剤。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は新規な抗動脈硬化剤に関するものである。更に詳しくは、本発明はヒトアポA-I・リン脂質複合体を有効成分として含有する新規な抗動脈硬化剤に関するものである。

<従来技術>

現在、各種血管病変の主要基礎疾患とされる粥状動脈硬化症(以下、動脈硬化症と記す)の主要原因の一つとして、血管壁への脂質、特にコレステロールエステルの蓄積が挙げられている。一方、

脂質代謝に様々な役割を果たしているとされる血漿リポ蛋白に関する研究が進展し、その一種である高比重リポ蛋白(以下、HDLと記す)については、動脈硬化症との関連で、HDLの持つ機能、特に血管壁からの遊離コレステロールの除去作用が注目されている。

一方、HDLの構成成分については、アポA-I以外にアポA-IIおよびその他のアポリポ蛋白成分並びに各種のリン脂質およびコレステロールが知られている。又、HDLはHDL₂およびHDL₃等に小分類することも可能である。

しかしながら、コレステロールの除去作用と動脈硬化症の改善については密接に結びついているわけではない。又、上記のHDLの各成分が動脈硬化症の改善に結びつくかどうか疫学的手法により種々解析が検討されつつあるが本疾患の多要因性のため解析が困難であり、未だ確定されるにいたっていない。

<発明が解決しようとする問題>

本発明者等は動脈硬化症の予防および治療効果

を有する物質の探索について鋭意検討した結果、ヒトアポA-I・リン脂質複合体が上記目的になうことを見出し本発明を完成した。

<発明の構成>

本発明はヒトアポA-I・リン脂質複合体を有効成分とする抗動脈硬化剤に関する。

リン脂質としてはフォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン(以下、BSP)等があげられるが、ジベルミトイルフォスファチジルコリン(以下、DPPC)等のフォスファチジルコリン、スフィンゴミエリンが好ましい。これらは、単独で使用してもよいが、2種類以上を併用してもよい。本発明にかかわる複合体におけるアポA-Iとリン脂質の構成比は特に制限はないが、リン脂質としてDPPC、BSPまたはDPPCとBSPを併用した場合には調製した複合体の品質から通常モル比で1:150~180、好ましくは1:180前後である。

・リン脂質複合体を製するに使用するアポA-Iは一般的方法、例えば、血清から超遠心分画法、セファクリルS-300等によるゲル濾過法およびDEAE-セルロース等によるイオン交換クロマトグラフィー法などを組合わせて分離、精製することにより調製し得る。

<発明の効果>

本発明の効果は①培養血管平滑筋細胞内からのコレステロール除去作用、②生体投与時における血清のHDL分画への量的および時間的分布状態、③動脈硬化症に対する改善効果および④安全性試験により確認した。

更に詳細に述べれば①の効果は

ヒト臍動脈またはウサギ胸部大動脈の外植体から培養したヒトまたはウサギ血管平滑筋細胞を用い、これ等に³H-コレステロールを取り込ませた培養細胞系を使用する試験方法等により確認し得た。

②の効果は

生体に及ぼす抗原抗体反応の影響を考慮して、

本発明にかかわる複合体はヒトアポA-Iとリン脂質とを使用して、一般的なりボソーム調製方法例えばコール酸透析法、超音波法、エタノール注入法、トリトンX-100パッチ法等により調製し得る。

このようにして調製した複合体は、ゲル濾過法により1ピークを示すことおよび電子顕微鏡観察により微小かつ均一の円板上粒子が連結したいわゆる^Uロー状粒子が殆どを占めていることから本発明にかかわるヒトアポA-I・リン脂質複合体が単なる混合物ではなく複合体を形成していること又、該複合体が均一性に優れていることを確認した。また、かかる複合体の形態は肝臓で生合成された未成熟のHDLと類似していることから両者の構造上の類似性が想定され、複合体を生体に投与した際、最も効果のある形態と考えられる。このようにして調製した複合体は安定な物質であり、例えば5℃以下の冷所に長期間安定に保存し得る。

なお、本発明の対象物質であるヒトアポA-I

例えば¹²⁵Iで標識したウサギアポA-Iから調製した¹²⁵I-ウサギアポA-I・DPPC・BSP複合体をウサギに投与し、血清中のリポ蛋白画分の放射活性を測定する等の方法により確認し得た。

③の効果は

高コレステロール食、例えばコレステロールおよびラードを添加した飼料等で飼育して大動脈などの血管壁にコレステロールを蓄積させたウサギの動脈硬化症モデルを作成する。次いでこのウサギ動脈硬化症モデルの胸部大動脈を摘出し、その病変部位、即ちアテローム部位および脂肪沈着部位の外植体の培養系を使用する試験方法等により確認し得た。

更に、この改善効果は、前記の高コレステロール食を負荷して作成したウサギ動脈硬化症モデルに前記ウサギアポA-I・リン脂質複合体、例えばウサギアポA-I・DPPC・BSP複合体等を投与し、大動脈および冠状動脈の病変部位について生化学的および病理学的検討を行なう方法により確認し得た。

④の効果、即ち、

アポA-I・DPPC・BSP複合体が極めて低毒性であることは、例えばウサギアポA-I・DPPC・BSP複合体のウサギに対する急性毒性試験（静脈内投与）を行なった結果、LD₅₀値は0.5g/kg以上であることなどから確認した。

猶、ウサギアポA-I・リン脂質複合体はヒトアポA-I・リン脂質複合体と、物理化学的性質、例えば分子量、アポ蛋白とリン脂質の組成比、形態及びコレステロール除去効果等において同等であることをゲル濾過、電顕観察並びに前記④の効果等により確認した。

本発明のヒトアポA-I・リン脂質複合体の投与量としては例えば長寿症候群の血清アポA-Iレベルを維持する量、即ち健康人の血清アポA-Iレベルの2倍以上を維持する量を挙げ得る。更に、詳しくはヒトアポA-I・リン脂質複合体の好ましい投与量及び投与方法としては、例えばアポA-I量に換算して、1回1.5g～3.5g/人づつ週2回、1ヶ月間またはそれ以上連続して静

温度（以下、^{T_c}DPPCのT_c:41℃、BSPのT_c:32℃、DPPC及びBSPの混合物のT_c:41℃）に10分間保つ。

次にヒトまたはウサギアポA-Iの前記緩衝液4.6ml（アポA-I量として602.6mg（リン脂質160モルに対してアポA-Iが1モルの割合））を加え、T_cで72時間インキュベートしてヒトまたはウサギアポA-I・リン脂質複合体を調製した。調製した複合体は更に生理的食塩水に対して4℃で72時間透析を行いコール酸ナトリウムを除去した。このようにして調製したヒト或いはウサギアポA-I・リン脂質複合体についてセファロースCL-4B（2.2×42cm）のカラムにより前記緩衝液でゲル濾過を行い、各溶出画分の蛋白量及びリン脂質量を測定した。その結果、ヒトアポA-I・リン脂質複合体及びウサギアポA-I・リン脂質複合体のいずれにおいてもリン脂質及びアポ蛋白の単一ピークが同一のフラクションに見られた。又、両複合体の分子量は約82万であり、アポA-Iとリン脂質との組成比

脈内投与する方法を挙げ得る。

本発明のヒトアポA-I・リン脂質複合体の製剤型としては、各種の製剤上及び生理学的に許容し得る剤型、例えば注射剤等を挙げ得る。

<実施例>

以下、本発明について実施例及び試験例を挙げて説明する。

実施例1（ヒトアポA-I・リン脂質複合体及びウサギアポA-I・リン脂質複合体の調製）

リン脂質は、DPPC単独、またはBSP単独、またはDPPCとBSPの等モル混合物の3つの組成を用いた。2510mgのリン脂質を10mlのクロロホルムに溶解した後に、窒素気流下で薄膜状に乾固させクロロホルムを完全に除く。次に緩衝液（10mM トリス-塩酸、1mM エチレンジアミン四酢酸、1mM アジ化ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム、pH 8.0）を10ml加え、70℃に加温して攪はんする。次に3020mgのコール酸ナトリウム（リン脂質1モルに対してコール酸ナトリウム2モルの割合）を加え、相転移

（モル比）は平均1:165であった。又、ヒト或はウサギアポA-I・リン脂質複合体について電子顕微鏡像より大きさを測定した。その結果、いずれの複合体もほぼ均一な直径200～300Å、厚さ50Åの円板状物質が数珠状につながった、いわゆるルーローを形成していることを認めた。

試験例1（ヒトアポA-I・リン脂質複合体及びウサギアポA-I・リン脂質複合体のヒト及びウサギ培養平滑筋細胞からのコレステロール除去作用）

ヒトの臍動脈またはウサギの胸大動脈の外植体から、10%胎児牛血清（FCS）と抗生物質を含有するダルベッコ改良イーブル（DMEM）培養液を用いて、平滑筋細胞を生育させた。細胞は5%二酸化炭素と95%空気の気相中、37℃で培養した。2週間培養した後にトリプシン処理を行い、二次培養を行った。このようにして作成したヒト或はウサギの平滑筋細胞を75mlコン

8047皿（培養面積2.0cm²/ウェル）に30000個/皿の細胞密度で5%FCSと抗生物質を含む

1 ml の D M E 培養液中で培養した。15 時間培養し、細胞が皿に付着した後に、培養液を 5 % F C S, 抗生物質と ^3H -コレステロール (0.25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) を含む 1 ml の D M E 培養液に交換して、さらに 48 時間培養を行い、 ^3H -コレステロールを細胞内に取り込ませた。48 時間培養後に前記の ^3H -コレステロールを含む培養液を除き、D M E 培養液で 3 回洗浄した。その後に被検群として、実施例 1 に準じて調製し、D M E 培養液で透析を行ったヒトまたはウサギアポ A - I・リン脂質複合体の D M E 培養液 (培養液 1 ml あたりアポ A - I 量として 5 ~ 100 μg 含む) 1 ml を被検培養液として加え、8 時間培養を行った後に、培養液及び細胞中の ^3H -コレステロールの放射活性を測定した。対照群は D M E 培養液で培養を行い、被検群及び対照群とも各群 4 枚の皿で実験を行った。コレステロール除去作用 (コレステロール除去率) は次式で表わした。

コレステロール除去率 (%)

$$\frac{\text{培養液中の } ^3\text{H}\text{-コレステロール RA}}{\text{培養液中の } ^3\text{H}\text{-コレステロール RA} + \text{細胞中の } ^3\text{H}\text{-コレステロール RA}} \times 100$$

(上式中 RA は放射活性を意味する。)

ヒトまたはウサギアポ A - I・リン脂質複合体のヒト培養血管平滑筋細胞に対するコレステロール除去作用を表 1 に示した。ヒトアポ A - I・D P P C・B S P 複合体、ヒトアポ A - I・D P P C 複合体及びヒトアポ A - I・B S P 複合体はヒト培養血管平滑筋細胞に対して強いコレステロール除去作用を示し、ウサギアポ A - I・D P P C・B S P 複合体もヒト培養血管平滑筋細胞に対してコレステロール除去作用を示した。

表 1

	アポ A - I 量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	コレステロール除去率 (%)
対 照	0	18.3 ± 3.54
ヒトアポ A - I・ DPPC・BSP 複合体	100	63.8 ± 1.61
	50	62.5 ± 0.91
	5	43.2 ± 3.68
ヒトアポ A - I・ DPPC 複合体	100	64.8 ± 1.63
	50	59.1 ± 2.71
	5	35.9 ± 3.12
ヒトアポ A - I・ BSP 複合体	100	64.6 ± 0.42
	50	61.8 ± 1.62
	5	40.2 ± 3.82
ウサギアポ A - I・ DPPC・BSP 複合体	100	61.9 ± 1.76
	50	59.8 ± 2.32
	5	34.3 ± 5.46

ヒトアポ A - I・リン脂質複合体及びウサギアポ A - I・リン脂質複合体のウサギ培養血管平滑筋細胞に対するコレステロール除去作用を表 2 に示した。ウサギアポ A - I・D P P C・B S P 複

合体はウサギ培養血管平滑筋細胞に対して強いコレステロール除去作用を示した。また、ヒトアポ A - I・D P P C・B S P 複合体及びヒトアポ A - I・D P P C 複合体も共にウサギ培養血管平滑筋細胞に対して強いコレステロール除去作用を示し、その作用の強さはウサギアポ A - I・D P P C・B S P 複合体と同程度であった。

表 2

	アポ A - I 量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	コレステロール除去率 (%)
対 照	0	18.0 ± 0.50
ヒトアポ A - I・ DPPC・BSP 複合体	100	87.2 ± 1.48
	20	78.1 ± 2.71
ヒトアポ A - I・ DPPC 複合体	100	83.1 ± 2.04
	20	67.1 ± 0.74
ウサギアポ A - I・ DPPC・BSP 複合体	100	80.8 ± 0.82
	20	68.8 ± 0.80

試験例 2 (ウサギアポ A - I・リン脂質複合体投与後の血清リポ蛋白画分への分布)

1-塩化ヨウ素法によりラベルした ^{125}I -ウサ

ギアボA-Iを用いて、実施例1に準じて ^{125}I -ウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体を調製した。正常ウサギに1mlの ^{125}I -ウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体の生理的食塩水(アボA-I量として $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、放射活性; $2 \times 10^6\text{cpm}/\text{ml}$)を耳静脈より静注し、投与88時間後の血清を超速心法により超低比重リポ蛋白(VLDL)、低比重リポ蛋白(LDL)、HDL及び超高比重リポ蛋白(VHDL)を分離し、各リポ蛋白画分の ^{125}I の放射活性を測定した。表8に示す様に、 ^{125}I -ウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体は投与88時間後にはほとんどHDL画分に存在していた。

表 3

	投与88時間後の血清中の ^{125}I -アボA-Iの放射活性の割合(%)
VLDL ($d < 1.006$)	0.3
LDL ($1.006 < d < 1.063$)	5.7
HDL ($1.063 < d < 1.21$)	82.3
VHDL ($1.21 < d$)	11.2

液を交換して10日間、 37°C 、5%二酸化炭素、95%空気の気相中で培養した。全外植体及び培養液のコレステロールはイソプロピルアルコール-n-ヘキサン(2:3)で抽出し、高速液体クロマトグラフィーで測定した。コレステロール除去作用(コレステロール除去率)は次式で表わした。

コレステロール除去率(%)

$$= \frac{\text{培養液のコレステロール量}}{\text{外植体のコレステロール量} + \text{培養液のコレステロール量}} \times 100$$

表4に示す様に、ウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体は対照の約4~7倍のコレステロール除去率を示し、その作用は脂肪沈着部位においてとくに明確であった。

表 4

	コレステロール除去率(%)	
	アテローム部位	脂肪沈着部位
対 照	7.68	6.17
ウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体	27.20	48.61

試験例3(ウサギアボA-I・リン脂質複合体の動脈硬化症ウサギの大動脈から調製した外植体に対するコレステロール除去作用)

ニュージーランドホワイトの雄性ウサギを0.5%コレステロール及び5%ラードを添加した飼料で10週間飼育後、正常食でさらに8週間飼育し大動脈にコレステロールが蓄積した動脈硬化症ウサギを作成した。この動脈硬化症ウサギの胸大動脈を無菌的に取り出し、脂肪を取り除き、外膜をつけたままアテローム部位と脂肪沈着部位を分離した。それぞれの部位を $1 \times 2\text{mm}$ の切片に切り、外植体として使用した。被検培養液としては、5%FGSと抗生物質を含むDMEM培養液に、実施例1に準じて調製したウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体(アボA-I量として $2\text{mg}/\text{ml}$)を加えたものを使用し、対照は5%FGSと抗生物質を含むDMEM培養液を使用した。外植体20個を2mlの培養液を加えた50mlの培養フラスコ(ファルコン3013(ベクトン、ジヤッキンソン社製))中、3日、6日及び8日後の計3回培養

試験例4(ウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体の動脈硬化症ウサギへの投与による動脈硬化改善効果)

ニュージーランドホワイトの雄性ウサギを0.5%コレステロール及び5%ラードを含む飼料で10週間飼育後、さらに正常食で5週間飼育し、血管壁にコレステロールが蓄積した動脈硬化症ウサギを38匹作成した。この動脈硬化症ウサギの中より、血清コレステロール値、虹彩の脂肪沈着の同程度のものを8匹選抜して実験に使用した。被検群には実施例1に従って調製し、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターを通して無菌にしたウサギアボA-I・DPPC・BSP複合体の生理的食塩水(1mlあたりアボA-I量として、 10mg を含む)を2匹のウサギに、 $4\text{ml}/\text{kg}$ の割合で、2日おきに4週間、計10回、耳静脈より静注した。対照群には生理的食塩水を $4\text{ml}/\text{kg}$ の割合で6匹のウサギに静注した。

屠殺時の血清のアボA-I及び高比重リポ蛋白コレステロール量(HDL-コレステロール)を

測定して表5に示した。このウサギアポA-I・DPPC・BSP複合体を前記の動脈硬化症ウサギに投与することにより、血清のアポA-IとHDL-コレステロール量が増加し、血清コレステロールの改善効果を示した。また屠殺後摘出した大動脈のコレステロール量とその組成を高速液体クロマトグラフィーにより測定し表6に示した。このウサギアポA-I・DPPC・BSP複合体を前記の動脈硬化症ウサギに投与することにより血管壁のコレステロール量は減少し、また血管壁のコレステロール組成においてもオレイン酸コレステロールの割合が減少し、遊離コレステロールの割合が増加しており、血管壁での動脈硬化の改善効果が示された。

表5

	アポA-I量 (mg/dl)	HDL-コレステロール量 (mg/dl)
対 照	85.6	16.2
ウサギアポA-I DPPC-BSP複合体	197.6	45.2

冠状動脈)と分枝細小動脈に分けて血管の狭窄の発生頻度(狭窄血管数/全血管数×100)を測定した。その結果は表8に示す通り、ウサギアポA-I・リン脂質複合体の投与により、冠状動脈幹、分枝細小動脈ともに狭窄頻度の軽減化が見られ、冠状動脈に対しても動脈硬化の改善効果が認められた。

表8

	狭窄の発生頻度(%)	
	冠状動脈幹	分枝細小動脈
対 照	19.0	14.3
アポA-I DPPC-BSP複合体	8.3	9.6

表6

	コレステロール量 (mg/g)	コレステロール組成(%)	
		オレイン酸 コレステロール	遊離 コレステロール
対 照	26.0	45.8	38.4
ウサギアポA-I DPPC-BSP複合体	18.7	39.9	43.0

更に、大動脈についてアテローム性病巣及び脂肪沈着病巣を病変部位として、大動脈中の病変部位の占める割合を画像解析装置により測定し表7に示した。ウサギアポA-I・リン脂質複合体を投与したウサギ大動脈の病変部の割合は対照と比べて減少しており、血管壁での動脈硬化の改善効果が示された。

表7

	大動脈の病変部の割合(%)
対 照	81.4
アポA-I DPPC-BSP複合体	49.2

屠殺時摘出した心臓について連続切片を作成し、冠状動脈幹(左冠状動脈回折枝、前下行枝及び右